

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-136982

(43)Date of publication of application : 22.05.2001

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 9/00
C12N 9/88
C12P 19/26
//(C12N 15/09
C12R 1:15)
(C12N 15/09
C12R 1:31)
(C12N 15/09
C12R 1:46)
(C12N 15/09
C12R 1:85)
(C12N 15/09
C12R 1:01)
(C12N 1/19
C12R 1:85)
(C12N 1/21
C12R 1:19)
(C12N 1/21
C12R 1:15)
(C12N 1/21
C12R 1:31)
(C12N 1/21
C12R 1:46)
(C12N 1/21
C12R 1:01)
(C12P 19/26
C12R 1:19)
(C12P 19/26
C12R 1:15)
(C12P 19/26
C12R 1:31)
(C12P 19/26
C12R 1:46)
(C12P 19/26
C12R 1:85)
(C12P 19/26
C12R 1:01)

(21)Application number : 2000-257221

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 28.08.2000

(72)Inventor : KOIZUMI SOJI

TABATA KAZUHIKO

ENDO TETSUO

OZAKI AKIO

(30)Priority

Priority number : 11242670 Priority date : 30.08.1999 Priority country : JP

(54) METHOD FOR PRODUCING N-ACETYLNEURAMINIC ACID**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing N-acetylneuraminic acid at a low cost without the need for adding expensive raw material such as pyruvic acid or phosphoenolpyruvic acid.

SOLUTION: This method for producing N-acetylneuraminic acid comprises incorporating an aqueous medium with (1) a culture solution of microorganisms having N-acetylneuraminic acid aldolase activity or N-acetylneuraminic acid synthetase activity or a treated product of the above culture solution, (2) a culture solution of microorganisms having the ability to form pyruvic acid or a treated product of the above culture solution, or a culture solution of microorganisms having the ability to form phosphoenolpyruvic acid or a treated product of the above culture solution, (3) N-acetylmannosamine and (4) an energy source necessary for forming pyruvic acid or phosphoenolpyruvic acid to form and accumulate N-acetylneuraminic acid in the aqueous medium followed by collecting the N-acetylneuraminic acid thus formed from the aqueous medium.

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2001-136982
(P2001-136982A)

(43)公開日 平成13年 5 月22日 (2001.5.22)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/19	
1/19		1/21	
1/21		9/00	
9/00		9/88	
9/88		C 1 2 P 19/26	
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2000-257221(P2000-257221)	(71)出願人	000001029 協和醗酵工業株式会社 東京都千代田区大手町 1 丁目 6 番 1 号
(22)出願日	平成12年 8 月28日 (2000.8.28)	(72)発明者	小泉 聡司 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(31)優先権主張番号	特願平11-242670	(72)発明者	田畑 和彦 山口県防府市協和町 1 番 1 号 協和醗酵工業株式会社技術研究所内
(32)優先日	平成11年 8 月30日 (1999.8.30)	(72)発明者	遠藤 徹夫 東京都町田市旭町 3 丁目 6 番 6 号 協和醗酵工業株式会社東京研究所内
(33)優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 N-アセチルノイラミン酸の製造法

(57)【要約】

【課題】 ビルビン酸、ホスホエノールビルビン酸などの高価な原料を添加することなく、安価にN-アセチルノイラミン酸を製造する方法を提供する。

【解決手段】 水性媒体中に、①N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、②ビルビン酸の生成能を有する微生物の培養液または該培養液の処理物またはホスホエノールビルビン酸の生成能を有する微生物の培養液または該培養液の処理物、③N-アセチルマンノサミン、および④ビルビン酸またはホスホエノールビルビン酸の生成に必要なエネルギー源、を存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルノイラミン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルノイラミン酸を採取することを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法に関する。

!(2) 001-136982 (P2001-82

【特許請求の範囲】

【請求項1】 水性媒体中に、①N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、②上記①においてN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物を用いた場合にはビルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、上記①においてN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物を用いた場合にはホスホエノールビルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、③N-アセチルマンノサミン、および④ビルビン酸またはホスホエノールビルビン酸の生成に必要なエネルギー源、を存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルノイラミン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルノイラミン酸を採取することを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

【請求項2】 N-アセチルマンノサミンが、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルマンノサミンを生成蓄積させることにより得られるN-アセチルマンノサミンである、請求項1記載の製造法。

【請求項3】 N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物が、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物である、請求項2記載の製造法。

【請求項4】 N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAがシネコシスティス(Synechocystis)属に属する微生物由来のDNAである、請求項3記載の製造法。

【請求項5】 N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAである、請求項3または4記載の製造法。

(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA

(b) 配列番号2記載の塩基配列を有するDNA

【請求項6】 N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物である、請求項1～5のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項7】 N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属、ナイセリア属およびストレプトコッカス属から選ばれる属に属する微生物である、請求項1～6のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項8】 ビルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、請求

項1～7のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項9】 ホスホエノールビルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、請求項1～8のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項10】 エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである、請求項6～9のいずれか一項に記載の製造法。

【請求項11】 コリネバクテリウム属に属する微生物が、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクムおよび、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムである、請求項6、8または9記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物を用いたN-アセチルノイラミン酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】N-アセチルノイラミン酸の製造法として、抽出法、分解法、酵素を利用した方法等が知られている。抽出法としては、ウミツバメの巣などからの抽出する方法〔Carbohydrate Research, 56, 423 (1977)〕等が知られている。

【0003】分解法としては、大腸菌などが生産するN-アセチルノイラミン酸ポリマーであるコロミン酸を分解する方法〔J. Biochem., 82, 1425 (1977)〕等が知られている。酵素を利用した方法としては、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、ビルビン酸およびN-アセチルマンノサミンを用いて製造する方法〔J. Am. Chem. Soc., 110, 6481 (1988)、J. Am. Chem. Soc., 110, 7159 (1988)〕、アルカリ条件下で、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、ビルビン酸およびN-アセチルグルコサミンを用いて製造する方法〔米国特許第5,665,574号〕、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ、ビルビン酸およびN-アセチルグルコサミンを用いて製造する方法〔Angew. Chem.Int. Ed. Eng., 30, 827 (1991)、Carbohydrate Research, 306, 575 (1998)〕、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ、ホスホエノールビルビン酸およびN-アセチルマンノサミンを用いて製造する方法〔特開平10-4961、Glycobiology, 7, 697 (1997)〕が知られている。

【0004】上記N-アセチルノイラミン酸の製造法のいずれの方法においても、操作が煩雑あるいは、高価な原料であるビルビン酸またはホスホエノールビルビン酸を必要とするため、N-アセチルノイラミン酸の安価な製造法は確立されていない。

(3) 001-136982 (P2001-%-82

【0005】これまでに、微生物の培養物または該培養物の処理物を利用してN-アセチルノイラミン酸を製造することが可能であることに関する記載あるいは示唆されるものはない。N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼに関しては、動植物由来のものが知られており、微生物ではエシェリヒア属に属する微生物にその活性のあることが知られている。エシェリヒア属に属する微生物であるエシェリヒア・コリにおいては、該酵素をコードする遺伝子nanAも知られている〔Nucleic Acids Res., 13, 8843 (1985)〕。

【0006】N-アセチルノイラミン酸シンセターゼに関しては、エシェリヒア属、ナイセリア属、ストレプトコッカス属に属する微生物等において存在が知られており、エシェリヒア・コリにおいて該酵素をコードする遺伝子neuBが知られている〔J. Bacteriol., 177, 312 (1995)〕。

【0007】N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼに関しては、ブタおよびラットで該酵素の存在が知られており、ブタ由来の該酵素に関しては性質が調べられ〔Biochemistry, 17, 3363 (1970)〕、該酵素をコードする遺伝子〔J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)〕が取得されている。これまで、該酵素の活性を有する微生物は知られていない。

【0008】ビルビン酸の製造法としては、エシェリヒア・コリの変異株を用いたビルビン酸の製造法が知られている〔Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2164 (1994)〕。ホスホエノールビルビン酸の製造法としては、サッカロマイセス属などに属する微生物を用いたホスホエノールビルビン酸の製造法が知られている(特開平6-197778)。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ビルビン酸、ホスホエノールビルビン酸などの高価な原料を添加することなく、安価にN-アセチルノイラミン酸を製造する方法を提供することにある。また、本発明の目的は、高価なN-アセチルマンノサミンを用いることなくN-アセチルノイラミン酸を製造する方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、ビルビン酸またはホスホエノールビルビン酸の生成能を有する微生物を利用することにより、安価な原料から効率的にN-アセチルノイラミン酸が生成することを見出し本発明を完成するに至った。

【0011】即ち、本発明は以下の(1)～(11)に関する。

(1) 水性媒体中に、①N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性またはN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処

理物、②上記①においてN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物を用いた場合にはビルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、上記①においてN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物を用いた場合にはホスホエノールビルビン酸の生成能を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、③N-アセチルマンノサミン、および④ビルビン酸またはホスホエノールビルビン酸の生成に必要なエネルギー源、を存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルノイラミン酸を生成蓄積させ、該水性媒体中からN-アセチルノイラミン酸を採取することを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

【0012】(2) N-アセチルマンノサミンが、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でN-アセチルマンノサミンを生成蓄積させることにより得られるN-アセチルマンノサミンである、上記(1)の製造法。

【0013】(3) N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物が、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAを含むDNA断片とベクターとの組換え体DNAを保有する微生物である、上記(2)の製造法。

【0014】(4) N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAがシネコシスティス(Synechocystis)属に属する微生物由来のDNAである、上記(3)の製造法。

(5) N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼをコードするDNAが、以下の(a)または(b)のDNAである、上記(3)または(4)の製造法。

【0015】(a) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA

(b) 配列番号2記載の塩基配列を有するDNA

(6) N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物である、上記(1)～(5)のいずれか一つに記載の製造法。

【0016】(7) N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物がエシェリヒア属、ナイセリア属およびストレプトコッカス属から選ばれる属に属する微生物である、上記(1)～(6)のいずれか一つに記載の製造法。

(8) ビルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属する微生物である、上記(1)～(7)のいずれか一つに記載の製造法。

【0017】(9) ホスホエノールビルビン酸の生成能を有する微生物が、エシェリヒア属、コリネバクテリウム属およびサッカロマイセス属から選ばれる属に属す

(4) 001-136982 (P2001-0182)

る微生物である、上記(1)～(8)のいずれか一つに記載の製造法。

(10) エシェリヒア属に属する微生物がエシェリヒア・コリである、上記(6)～(9)のいずれか一つに記載の製造法。

【0018】(11) コリネバクテリウム属に属する微生物がコリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクムおよび、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラムである、上記(6)、

(8)または(9)の製造法。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0019】

【発明の実施の形態】本発明で用いられるN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性を有する微生物としては、該酵素活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えばエシェリヒア属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができる。

【0020】エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができる。コリネバクテリウム属に属する微生物としてはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム等をあげることができる。

【0021】また、該酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換体を用いることもできる。該形質転換体として、エシェリヒア・コリ由来のnanA遺伝子[Nucleic Acids Res., 13, 8843 (1985)]を含む組換え体DNAを有する微生物をあげることができ、具体的な例として、エシェリヒア・コリNM522/pTA3株等をあげることができる。エシェリヒア・コリNM522/pTA3株は、平成12年8月28日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所、日本国茨城県つくば市東1丁目3番(郵便番号305-8566)にFERM BP-7284として寄託されている。

【0022】本発明で用いられるN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性を有する微生物としては、該酵素活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えばエシェリヒア属、ナイセリア属、ストレプトコッカス属に属する微生物をあげることができる。

【0023】エシェリヒア属に属する微生物としてはエシェリヒア・コリ等をあげることができる。また、該酵素の活性を遺伝子組換え技術により増強した形質転換体を用いることもできる。該形質転換体として、エシェリヒア・コリ由来のneuB遺伝子[J. Bacteriol., 177, 312 (1995)]を含む組換え体DNAを有する微生物をあげることができ、具体的な例として、エシェリヒア・コリNM522/pYP18株等をあげることができる。エシェリヒア・コリNM522/pYP18株は、平成12年8月28日

付けで工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-7283として寄託されている。

【0024】ヒルビン酸生成能を有する微生物としては、該生成活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、エシェリヒア・コリ、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム、サッカロマイセス・セレビシエなどを例示することができる。また、変異手法あるいは遺伝子組換え手法により、該活性を増強した微生物を用いることもできる。エシェリヒア・コリの変異株としては、Biosci. Biotech. Biochem., 58, 2164 (1994)記載の株をあげることができる。

【0025】ホスホエノールヒルビン酸生成能を有する微生物としては、該生成活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、エシェリヒア・コリ、コリネバクテリウム・アンモニアゲネス、コリネバクテリウム・グルタミクム、コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム、サッカロマイセス・セレビシエなどを例示することができる。サッカロマイセス・セレビシエとしては、特開平6-197778に記載の株をあげることができる。また、変異手法あるいは遺伝子組換え手法により、該活性を増強した微生物を用いることもできる。

【0026】N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物としては、該酵素活性を有する微生物であればいずれの微生物も用いることができ、例えば該酵素の活性を遺伝子組換え手法により増強した形質転換体をあげることができる。該形質転換体の具体例として、ブタ由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子を含む組換え体DNA (pEPI1)を保有するエシェリヒア・コリ (FERM BP-4602: 米国特許第5,795,767号)またはシネコシスティス属に属する微生物由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを保有するエシェリヒア・コリNM522/pYP16株等をあげることができる。エシェリヒア・コリNM522/pYP16株は、平成12年8月28日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-7282として寄託されている。

【0027】シネコシスティス属に属する微生物由来のN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子としては、*Synechocystis* sp. PCC6803株の染色体に存在する、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしている遺伝子をあげることができる。より具体的には、配列番号2で示される塩基配列を有する遺伝子(slr1975)をあげることができる。配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2で示される塩基配列を有するDNAは、後述実施例に従い、本発明者らが初めて取得したものである。

【0028】N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性およびヒルビン酸生成能を有する微生物においては、

(5) 001-136982 (P2001-+傳率

該微生物1種のみを用い、N-アセチルマンノサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0029】N-アセチルノイラミン酸の製造において用いることのできるN-アセチルマンノサミンとしては、市販品等の標品をあげることができる。また、N-アセチルグルコサミンから、アルカリ条件下で化学的に、あるいはN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼを用い酵素的に変換することにより得られるN-アセチルマンノサミンを用いることができる。更に、N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性を有する微生物の培養物または該培養物の処理物、およびN-アセチルグルコサミンを水性媒体中に存在せしめ、生成蓄積されたN-アセチルマンノサミンを含む標品、または該標品から精製されたN-アセチルマンノサミンを用いることができる。

【0030】N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ活性およびN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性、並びにビルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルグルコサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0031】N-アセチルノイラミン酸の製造において用いることのできるN-アセチルグルコサミンとしては、市販品等の標品をあげることができる。N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性およびホスホエノールビルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルマンノサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0032】N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ活性およびN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ活性、並びにホスホエノールビルビン酸生成能を有する微生物においては、該微生物1種のみを用い、N-アセチルグルコサミンよりN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。上記活性あるいは生産能のいずれかが弱いあるいは欠失している微生物においては、弱いあるいは欠失している活性あるいは生産能を補うことのできる

る微生物と適宜組み合わせることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0033】また、N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成に際して用いる微生物は、増殖を伴った状態で生成反応に供してもよいし、培養終了後の微生物の培養物またはその処理物を生成反応に供してもよい。上述のように、N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの製造において、遺伝子組換え微生物を利用することも可能であるが、該遺伝子を含むプラスミドを保有する微生物からのプラスミドDNAの単離精製、プラスミドDNAの制限酵素による切断、切断したDNA断片の単離精製、DNA断片の酵素的結合、組換え体DNAを用いた形質転換等、遺伝子組換えに関する種々の操作は公知の方法〔例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)〕に準じて行うことができる。また、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション(以下PCRと略す)は公知の方法〔PCR Protocols, Academic Press (1990)〕に従って行うことができる。

【0034】N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの製造に関する遺伝子を宿主内で発現させるためには、該遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素類あるいはPCRで該遺伝子を含む適当な長さのDNA断片とした後に、適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入し、次いで上記DNAを挿入した発現ベクターを、発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより達成できる。

【0035】宿主細胞としては、細菌、酵母等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体への組込が可能で、目的とするDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

【0036】細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、遺伝子の発現ベクターは原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、目的とするDNA、転写終結配列、より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0037】発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2、pHelix1 (いずれもロシュ・ダイアグノスティクス社製)、pKK233-2、pKK223-3、pGEX-2T (いずれもアマシャム・ファルマシア・バイオテク社製)、pSE280 (インビトロジェン社製)、pGEMEX-1 (プロメガ社製)、pQE-8、pQE-30 (いずれもキアゲン社製)、pET-3

(6) 001-136982 (P2001-0:イ牽)

(ノバジェン社製)、pKYP10 (特開昭58-110600)、pKY P200 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBlue scriptII SK+ (ストラタジーン社製)、pBluescript II SK- (ストラタジーン社製)、pTrS30 [大腸菌JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrS32 [大腸菌JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28 (宝酒造社製)、pUC118 (宝酒造社製)、pPAC31 (W098/12343)、pPA1 (特開昭63-233798) 等を例示することができる。

【0038】プロモーターとしては、大腸菌等の宿主細胞中で発現できるものであればいかなるものでもよい。例えば、*trp* プロモーター (P_{trp})、*lac* プロモーター (P_{lac})、P_L プロモーター、P_R プロモーター、P_{SE} プロモーター等の、大腸菌やファージ等に由来するプロモーター、SPO1 プロモーター、SPO2 プロモーター、penP プロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター、*tac* プロモーター、*lacT7* プロモーター、*let I* プロモーターのように人為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

【0039】リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列と開始コドンとの間を適当な距離 (例えば6~18塩基) に調節したプラスミドを用いることが好ましい。本発明の組換え体DNAにおいては、目的とするDNAの発現には転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。

【0040】原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュドモナス属等に属する微生物、例えば、*Escherichia coli* XL1-B lue、*Escherichia coli* XL2-Blue、*Escherichia coli* DH1、*Escherichia coli* MC1000、*Escherichia coli* W1485、*Escherichia coli* NM522、*Escherichia coli* JM109、*Escherichia coli* HB101、*Escherichia coli* No.49、*Escherichia coli* W3110、*Escherichia coli* NY49、*Serratia ficaria*、*Serratia fonticola*、*Serratia liquefaciens*、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、*Brevibacterium saccharolyticum* ATCC14066、*Corynebacterium ammoniagenes*、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13032、*Corynebacterium glutamicum* ATCC14067、*Corynebacterium glutamicum* ATCC13869、*Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC13870、*Microbacterium ammoniaphilum* ATCC15354、*Pseudomonas* sp. D-0110等をあげることができる。

【0041】組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用い

ることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Research, 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

【0042】酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YEp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等を用いることができる。プロモーターとしては、酵母菌株中で発現できるものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10プロモーター、ヒートショックボリペプチドプロモーター、MF α 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

【0043】宿主細胞としては、サッカロマイセス属、シゾサッカロマイセス属、クルイベロミセス属、トリコスボロン属、シワニオミセス属、ピチア属、キャンディダ属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe*、*Kluyveromyces lactis*、*Trichosporon pullulan* s、*Schwanniomyces alluvius*、*Pichia pastoris*、*Candida utilis*等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods in Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] 等をあげることができる。

【0044】本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。大腸菌等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機物等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0045】炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、シュクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

【0046】窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

(7) 001-136982 (P2001-E' 姓)

【0047】無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好気的条件下で行う。培養温度は15～40℃がよく、培養時間は、通常5時間～7日間である。培養中pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

【0048】また、培養中に必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、*lac*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド等を、*trp*プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

【0049】培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

【0050】N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成において用いられる微生物の量は、用いる各微生物各々について、湿菌体として1～500g/lであり、好ましくは1～300g/lである。ビルビン酸またはホスホエノールビルビン酸の生成に必要なエネルギー源としては、生成を促すものであればいずれも用いることができるが、好適にはグルコースやフラクトースなどをあげることができる。これらエネルギー源は、通常10～300g/lの濃度で用いられる。

【0051】N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成において用いられる水性媒体としては、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類などをあげることができる。また、N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成において用いられる微生物の培地、培養物等を水性媒体として用いることができる。

【0052】N-アセチルノイラミン酸またはN-アセ

チルマンノサミンの生成において、必要に応じてフィチン酸等のキレート剤、界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン（例えばナイミーンS-215、日本油脂社製）などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド（例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製）などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン（例えば三級アミンFB、日本油脂社製）などの三級アミン類など、N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1～50g/lの濃度で用いられる。

【0053】有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどがあげられ、通常0.1～50ml/lの濃度で用いられる。N-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの生成反応は、水性媒体中、pH5～10、好ましくはpH6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。該生成反応を促進させるために、アデニン、アデノシン-5'-リン酸（AMP）、アデノシン-5'-三リン酸（ATP）、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウムなどを添加することができる。アデニン、AMP、ATPは、通常0.01～100mmol/lの濃度で用いられる。

【0054】水性媒体中に生成したN-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの定量はDionex社製の糖分析装置などを用いて行うことができる〔Anal. Biochem., 189, 151 (1990)〕。反応液中に生成したN-アセチルノイラミン酸またはN-アセチルマンノサミンの採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができる。以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例】

【0055】実施例1. エシェリヒア・コリ由来のN-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子発現株の造成
Escherichia coli W3110(ATCC27325)株をカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により培養後、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

【0056】配列番号3記載のDNAプライマーと配列番号4記載のDNAプライマーをパーセアティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した。

【0057】上記合成DNAをプライマーとして用い、*Escherichia coli* W3110(ATCC27325)株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは染色体DNA

(8) 001-136982 (P2001-1) 釘牽

0.1 μ g、プライマー各0.5 μ mol/l、Pfu DNAポリメラーゼ (STRATAGENE社製) 2.5 unit s、Pfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液 (STRATAGENE社製) 4 μ l、deoxyNTP各200 μ mol/lを含む反応液40 μ lを用い、94℃-1分間、42℃-2分間、72℃-3分間の工程を1サイクルとして30サイクル繰り返すことにより行った。

【0058】該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE [10mmol/l Tris-HCl (pH8.0)、1mmol/l EDTA] 飽和フェノール/クロロホルム (1vol/1vol) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分間放置した。該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得た。該DNAの沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素Hind IIIおよびBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキット (バイオ101社製) により1.2 kbの断片を回収した。pUC19 DNA [Gene, 33, 103 (1985)] 0.2 μ gを制限酵素Hind IIIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に2.7 kbの断片を回収した。

【0059】該1.2 kbおよび2.7 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いて、ビルビン酸生産能を有するEscherichia coli NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。

【0060】生育してきた形質転換体のコロニーより、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子nanAを保有する形質転換体Escherichia coli NM522/pTA3を取得した。該菌株より、公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子発現プラスミドであるpTA3を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (図1)。

【0061】実施例2. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例1で得たEscherichia coli NM522/pTA3株をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB培地125 mlの入った1L容バッフル付き三角フラスコに接種し、28℃で220 rpmの条件で17時間培養した。該培養液125 mlをグルコース 10 g/l、バクトリアプトン (ディフコ社製) 12 g/l、酵母エキス (ディフコ社製) 24 g/l、KH₂PO₄ 2.3 g/l、K₂HPO₄ 12.5 g/l、アンピシリン 50 μ g/mlの組成からなる液体培地 (pH無調整) 2.5 Lの入った5 L容培養槽に接種し、37℃で6時間、600 rpm、

通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを7.0に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0062】Escherichia coli NM522/pTA3株湿菌体 50 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルマンノサミン 40 g/l、KH₂PO₄ 25 g/l、MgSO₄·7H₂O 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミンS-215 4 g/l、キシレン 10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で25時間反応を行った。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、KH₂PO₄を添加した。

【0063】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析し、反応液中に0.34 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0064】実施例3. エシェリヒア・コリ由来のN-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子発現株の造成 Escherichia coli K235 (ATCC13027) 株をカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により培養後、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

【0065】配列番号5記載のDNAプライマーと配列番号6記載のDNAプライマーをパーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて合成した。

【0066】上記合成DNAをプライマーとして用い、Escherichia coli K235 (ATCC13027) 株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。PCRは染色体DNA 0.1 μ g、プライマー各0.5 μ mol/l、Pfu DNAポリメラーゼ (STRATAGENE社製) 2.5 unit s、Pfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液 (STRATAGENE社製) 4 μ l、deoxyNTP各200 μ mol/lを含む反応液40 μ lを用い、94℃-1分間、42℃-2分間、72℃-3分間の工程を1サイクルとして30サイクル繰り返すことにより行った。

【0067】該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム (1vol/1vol) を添加し、混合した。該混合液を遠心分離後、得られた上層に2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分間放置した。該放置液を遠心分離しDNAの沈殿を得た。

【0068】該DNAの沈殿を20 μ lのTEに溶解した。該溶解液5 μ lを用い、DNAを制限酵素Cla I

(9) 001-136982 (P2001-#82)

および *Bam*HI で切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキット（バイオ101社製）により1.1 kbの断片を回収した。pPAC31 DNA (W098/12343) 0.2 μ gを制限酵素 *Cla*I および *Bam*HI で切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、同様に5.5 kbの断片を回収した。

【0069】該1.1 kbおよび5.5 kbの断片をライゲーションキットを用いて、16°C、16時間、連結反応を行った。該連結反応液を用いてホスホエノールピルビン酸生産能を有する *Escherichia coli* NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン50 μ g/mlを含むLB寒天培地に塗布後、30°Cで一晩培養した。

【0070】生育してきた形質転換体のコロニーより、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子 *neuB* を保有する形質転換体 *Escherichia coli* NM522/pYP18を取得した。該菌株より、公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子発現プラスミドであるpYP18を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した（図2）。

【0071】実施例4. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例3で得た *Escherichia coli* NM522/pYP18株をアンピシリン 50 μ g/mlを含むLB培地125 mlの入った1 L容バッフル付き三角フラスコに接種し、28°Cで220 rpmの条件で17時間培養した。該培養液125 mlをグルコース 10 g/l、バクトトリプトン（ディフコ社製）12 g/l、酵母エキス（ディフコ社製）24 g/l、KH₂PO₄ 2.3 g/l、K₂HPO₄ 12.5 g/l、アンピシリン 50 μ g/mlの組成からなる液体培地（pH無調整）2.5 Lの入った5 L容培養槽に接種し、37°Cで4時間培養した後、40°Cで3時間、600 rpm、通気量2.5 L/分の条件で培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを7.0に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20°Cで保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0072】 *Escherichia coli* NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルマンノサミン 40 g/l、KH₂PO₄ 25 g/l、MgSO₄·7H₂O 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌（900 rpm）し、32°Cで19時間反応を行った。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、KH₂

PO₄を添加した。

【0073】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に1.4 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0074】実施例5. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例3で得た *Escherichia coli* NM522/pYP18株を実施例2記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20°Cで保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0075】 *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170株をグルコース 50 g/l、ポリペプトン（日本製薬社製）10 g/l、酵母エキス（オリエンタル酵母社製）10 g/l、尿素 5 g/l、(NH₄)₂SO₄ 5 g/l、KH₂PO₄ 1 g/l、K₂HPO₄ 3 g/l、MgSO₄·7H₂O 1 g/l、CaCl₂·2H₂O 0.1 g/l、FeSO₄·7H₂O 10 mg/l、ZnSO₄·7H₂O 10 mg/l、MnSO₄·4~6H₂O 20 mg/l、L-システイン 20 mg/l、D-パントテン酸カルシウム 10 mg/l、ビタミンB₁ 5 mg/l、ニコチン酸 5 mg/l、およびビオチン 30 μ g/l（10N NaOHでpH7.2に調整）の組成からなる液体培地25 mlの入った300 ml容バッフル付き三角フラスコに接種し、28°C、220 rpmの条件で、24時間培養した。

【0076】該培養液20 mlを上記と同一組成の液体培地250 mlの入った2 L容バッフル付き三角フラスコに接種し、28°C、220 rpmの条件で、24時間培養した。得られた培養液を種培養液として用いた。該種培養液250 mlを、グルコース 150 g/l、肉エキス（極東製薬社製）5 g/l、KH₂PO₄ 10 g/l、K₂HPO₄ 10 g/l、MgSO₄·7H₂O 10 g/l、CaCl₂·2H₂O 0.1 g/l、FeSO₄·7H₂O 20 mg/l、ZnSO₄·7H₂O 10 mg/l、MnSO₄·4~6H₂O 20 mg/l（別殺菌）、 β -アラニン 15 mg/l（別殺菌）、L-システイン 20 mg/l、ビオチン 100 μ g/l、尿素 2 g/l、およびビタミンB₁ 5 mg/l（別殺菌）（10N NaOHでpH7.2に調整）の組成からなる液体培地2.25 Lの入った5 L容培養槽に接種し、32°C、600 rpm、通気量2.5 L/分の条件で24時間培養を行った。培養中、28%アンモニア水を用いて、培養液のpHを6.8に維持した。

【0077】該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20°Cで保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。 *Escherichia coli* NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、 *Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170株湿菌体 150 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルマンノサ

(0) 0 1 - 1 3 6 9 8 2 (P 2 0 0 1 - 橋 率)

ミン 40 g/l、KH₂PO₄ 25 g/l、MgSO₄ · 7H₂O 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で6時間反応を行った。反応中、4N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、KH₂PO₄を添加した。

【0078】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて分析し、反応液中に 3.1 g/l の N-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0079】実施例6. シネコシスティス由来の N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼ遺伝子発現株の作成
ブタ由来の N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼのアミノ酸配列 [J. Biol. Chem., 271, 16294 (1996)] を Query として、Genbank の Blast Search および *Synechocystis* sp. (PCC6803) 株のゲノム配列のデータベースである CyanoBase (<http://www.kazusa.or.jp/cyano/>) において相同性検索 (Similarity Search) を行った結果、該アミノ酸配列は renin-binding protein との記載のある *Synechocystis* sp. (PCC6803) 由来の配列 (slr1975) と高い相同性を示した。

【0080】*Synechocystis* sp. (PCC6803) 株を J. Gen. Microbiol., 111, 1 (1979) に記載の方法で培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の方法により、該微生物の染色体 DNA を単離精製した。パーセプティブ・バイオシステムズ社製 8905 型 DNA 合成機を用いて合成した配列番号 7 および 8 に記載の DNA をプライマーとして用いて、*Synechocystis* sp. (PCC6803) 株の染色体 DNA を鋳型として実施例1記載の方法に従って PCR 反応を行った。

【0081】該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、目的の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール/クロロホルム (1 v o l / 1 v o l) を添加し、混合した。

【0082】該混合液を遠心分離後、得られた上層に 2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80℃に30分放置した。該放置液を遠心分離し DNA の沈殿を得た。該 DNA の沈殿を 200 μl の TE に溶解した。該溶解液 5 μl を用い、DNA を制限酵素 *Cla*I および *Bam*HI で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン II キット (バイオ101社製) により 1.2 kb の DNA 断片を回収した。

【0083】pPAC31 DNA 0.2 μg を制限酵素 *Cla*I および *Bam*HI で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、同様に 5.5 kb の DNA 断片を回収した。該 1.2 kb および 5.5 kb

の断片をライゲーションキットを用いて、16℃、16時間、連結反応を行った。

【0084】該連結反応液を用いて *Escherichia coli* NM522 株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン 50 μg/ml を含む LB 寒天培地に塗布後、30℃で一晩培養した。生育してきた形質転換体のコロニーより、*Synechocystis* sp. 由来の N-アセチルグルコサミン 2-エピメラーゼをコードする DNA を保有する形質転換体 *Escherichia coli* NM522/pYP16 を取得した。該菌株より、公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、発現プラスミドである pYP16 を得た。該プラスミドの構造を制限酵素消化により確認した (図3)。

【0085】実施例7. N-アセチルノイラミン酸の生産
実施例1で得た *Escherichia coli* NM522/pTA3 株を実施例2記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0086】実施例6で得た *Escherichia coli* NM522/pYP16 株をアンピシリン 50 μg/ml を含む LB 培地 125 ml の入った 1 L 容バフフル付き三角フラスコに接種し、28℃で220 rpm の条件で17時間培養した。該培養液 125 ml をグルコース 10 g/l、バクトトリプトン (ディフコ社製) 12 g/l、酵母エキス (ディフコ社製) 24 g/l、KH₂PO₄ 2.3 g/l、K₂HPO₄ 12.5 g/l、アンピシリン 50 μg/ml の組成からなる液体培地 (pH 無調整) 2.5 L の入った 5 L 容培養槽に接種し、30℃で4時間培養した後、40℃で3時間、600 rpm、通気量 2.5 L/分の条件で培養を行った。培養中、2.8% アンモニア水を用いて、培養液の pH を 7.0 に維持した。また、培養途中で必要に応じてグルコースを添加した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0087】*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170 株を、実施例5記載の方法で培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。*Escherichia coli* NM522/pTA3 株湿菌体 50 g/l、*Escherichia coli* NM522/pYP16 株湿菌体 50 g/l、*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170 株湿菌体 150 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、KH₂PO₄ 25 g/l、MgSO₄ · 7H₂O 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーン S-215 4 g/l、キシレン 10 ml/l の組成からなる反応液 30 ml を 200 ml 容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌 (900 rpm) し、32℃で24時間反応を

(1) 0 1 - 1 3 6 9 8 2 (P 2 0 0 1 - * 味 牽

行った。反応中、4 N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

【0088】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に1.0 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0089】実施例8. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例3で得た*Escherichia coli* NM522/pYP18株および実施例6で得た*Escherichia coli* NM522/pYP16株を実施例4および7記載の方法に準じてそれぞれ培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0090】*Escherichia coli* NM522/pYP16株湿菌体 50 g/l、*Escherichia coli* NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、 KH_2PO_4 25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン 10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900 rpm)し、32℃で11時間反応を行った。反応中、4 N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

【0091】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に1.3 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0092】実施例9. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例3で得た*Escherichia coli* NM522/pYP18株および実施例6で得た*Escherichia coli* NM522/pYP16株を実施例4および7記載の方法に準じてそれぞれ培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0093】*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170株を実施例5記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。*Escherichia coli* NM522/pYP16株湿菌体 50 g/l、*Escherichia coli* NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170株湿菌体 150 g/l、フラクトース 65 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、 KH_2PO_4 25 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン 10

ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900 rpm)し、32℃で24時間反応を行った。反応中、4 N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてフラクトース、 KH_2PO_4 を添加した。

【0094】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に4.3 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0095】実施例10. N-アセチルノイラミン酸の生産

実施例3で得た*Escherichia coli* NM522/pYP18株および実施例6で得た*Escherichia coli* NM522/pYP16株を実施例4および7記載の方法に準じてそれぞれ培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

【0096】*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170株を実施例5記載の方法により培養し、遠心分離により湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20℃で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。*Escherichia coli* NM522/pYP16株湿菌体 50 g/l、*Escherichia coli* NM522/pYP18株湿菌体 50 g/l、*Corynebacterium ammoniagenes* ATCC21170株湿菌体 150 g/l、グルコース 100 g/l、N-アセチルグルコサミン 180 g/l、アデニン 5 g/l、 KH_2PO_4 15 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l、フィチン酸 5 g/l、ナイミーンS-215 4 g/l、キシレン 10 ml/lの組成からなる反応液30 mlを200 ml容ビーカーに入れ、該反応液をマグネティック・スターラーにて攪拌(900 rpm)し、32℃で22時間反応を行った。反応中、4 N NaOHを用いて、該反応液のpHを7.2に維持し、必要に応じてグルコース、 KH_2PO_4 を添加した。

【0097】反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し、反応液中に12.3 g/lのN-アセチルノイラミン酸が生成蓄積していることを確認した。

【0098】

【発明の効果】本発明により、ビルビン酸などの高価な原料を添加することなくN-アセチルノイラミン酸を効率的に製造できる。

【0099】

【配列表フリーテキスト】

配列番号3-人工配列の説明：合成DNA

配列番号4-人工配列の説明：合成DNA

配列番号5-人工配列の説明：合成DNA

配列番号6-人工配列の説明：合成DNA

配列番号7-人工配列の説明：合成DNA

(第2) 01-136982 (P2001-01)

配列番号8-人工配列の説明：合成DNA

【配列表】

【0100】

SEQUENCE LISTING

<;110>; KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.
 <;120>; Process for producing N-acetylneuraminic acid
 <;130>; H12-1281J4
 <;140>;
 <;141>;
 <;160>; 8
 <;170>; PatentIn Ver. 2.0
 <;210>; 1
 <;211>; 391
 <;212>; PRT
 <;213>; Synechocystis sp.(PCC6803)
 <;400>; 1
 Met Ile Ala His Arg Arg Gln Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Ala
 1 5 10 15
 Leu His Gln Asp Val Leu Pro Phe Trp Glu Lys Tyr Ser Leu Asp Arg
 20 25 30
 Gln Gly Gly Gly Tyr Phe Thr Cys Leu Asp Arg Lys Gly Gln Val Phe
 35 40 45
 Asp Thr Asp Lys Phe Ile Trp Leu Gln Asn Arg Gln Val Trp Gln Phe
 50 55 60
 Ala Val Phe Tyr Asn Arg Leu Glu Pro Lys Pro Gln Trp Leu Glu Ile
 65 70 75 80
 Ala Arg His Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg His Gly Arg Asp Gln Asp
 85 90 95
 Gly Asn Trp Tyr Phe Ala Leu Asp Gln Glu Gly Lys Pro Leu Arg Gln
 100 105 110
 Pro Tyr Asn Val Phe Ser Asp Cys Phe Ala Ala Met Ala Phe Ser Gln
 115 120 125
 Tyr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Gln Glu Ala Lys Ala Ile Ala Leu Gln
 130 135 140
 Ala Tyr Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln His Asn Pro Lys Gly Gln Tyr
 145 150 155 160
 Glu Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Arg Pro Leu Lys Ser Leu Ala Val Pro
 165 170 175
 Met Ile Leu Ala Asn Leu Thr Leu Glu Met Glu Trp Leu Leu Pro Pro
 180 185 190
 Thr Thr Val Glu Glu Val Leu Ala Gln Thr Val Arg Glu Val Met Thr
 195 200 205
 Asp Phe Leu Asp Pro Glu Ile Gly Leu Met Arg Glu Ala Val Thr Pro
 210 215 220
 Thr Gly Glu Phe Val Asp Ser Phe Glu Gly Arg Leu Leu Asn Pro Gly
 225 230 235 240
 His Gly Ile Glu Ala Met Trp Phe Met Met Asp Ile Ala Gln Arg Ser
 245 250 255
 Gly Asp Arg Gln Leu Gln Glu Gln Ala Ile Ala Val Val Leu Asn Thr

(3) 0 1 - 1 3 6 9 8 2 (P 2 0 0 1 - 0 1)

260	265	270	
Leu Glu Tyr Ala Trp Asp Glu Glu Phe Gly Gly Ile Phe Tyr Phe Leu			
275	280	285	
Asp Arg Gln Gly His Pro Pro Gln Gln Leu Glu Trp Asp Gln Lys Leu			
290	295	300	
Trp Trp Val His Leu Glu Thr Leu Val Ala Leu Ala Lys Gly His Gln			
305	310	315	320
Ala Thr Gly Gln Glu Lys Cys Trp Gln Trp Phe Glu Arg Val His Asp			
325	330	335	
Tyr Ala Trp Ser His Phe Ala Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly			
340	345	350	
Tyr Leu Asn Arg Arg Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Lys Gly Gly Lys			
355	360	365	
Trp Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Glu			
370	375	380	
Thr Leu Gln Leu Pro Val Ser			
385	390		
<;210>; 2			
<;211>; 1173			
<;212>; DNA			
<;213>; Synechocystis sp. (PCC6803)			
<;400>; 2			
atg att gcc cat cgc cgt cag gag tta gcc cag caa tat tac cag gct	48		
Met Ile Ala His Arg Arg Gln Glu Leu Ala Gln Gln Tyr Tyr Gln Ala			
1 5 10 15			
tta cac cag gac gta ttg ccc ttt tgg gaa aaa tat tcc ctc gat cgc	96		
Leu His Gln Asp Val Leu Pro Phe Trp Glu Lys Tyr Ser Leu Asp Arg			
20 25 30			
cag ggg ggc ggt tac ttt acc tgc tta gac cgt aaa ggc cag gtt ttt	144		
Gln Gly Gly Gly Tyr Phe Thr Cys Leu Asp Arg Lys Gly Gln Val Phe			
35 40 45			
gac aca gat aaa ttc att tgg tta caa aac cgt cag gta tgg cag ttt	192		
Asp Thr Asp Lys Phe Ile Trp Leu Gln Asn Arg Gln Val Trp Gln Phe			
50 55 60			
gcc gtt ttc tac aac cgt ttg gaa cca aaa ccc caa tgg tta gaa att	240		
Ala Val Phe Tyr Asn Arg Leu Glu Pro Lys Pro Gln Trp Leu Glu Ile			
65 70 75 80			
gcc cgc cat ggt gct gat ttt tta gct cgc cac ggc cga gat caa gac	288		
Ala Arg His Gly Ala Asp Phe Leu Ala Arg His Gly Arg Asp Gln Asp			
85 90 95			
ggt aat tgg tat ttt gct ttg gat cag gaa ggc aaa ccc ctg cgt caa	336		
Gly Asn Trp Tyr Phe Ala Leu Asp Gln Glu Gly Lys Pro Leu Arg Gln			
100 105 110			
ccc tat aac gtt ttt tcc gat tgc ttc gcc gcc atg gcc ttt agt caa	384		
Pro Tyr Asn Val Phe Ser Asp Cys Phe Ala Ala Met Ala Phe Ser Gln			
115 120 125			
tat gcc tta gcc agt ggg gcg cag gaa gct aaa gcc att gcc ctg cag	432		
Tyr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Gln Glu Ala Lys Ala Ile Ala Leu Gln			
130 135 140			

(4) 0 1 - 1 3 6 9 8 2 (P 2 0 0 1 - e 牧 率)

```

gcc tac aat aac gtc cta cgc cgt cag cac aat ccc aaa ggt caa tac 480
Ala Tyr Asn Asn Val Leu Arg Arg Gln His Asn Pro Lys Gly Gln Tyr
145          150          155          160

gag aag tcc tat cca ggt act aga ccc ctc aaa tcc ctg gcg gtg ccg 528
Glu Lys Ser Tyr Pro Gly Thr Arg Pro Leu Lys Ser Leu Ala Val Pro
          165          170          175

atg att tta gcc aac ctc acc ctg gag atg gaa tgg tta tta ccg cct 576
Met Ile Leu Ala Asn Leu Thr Leu Glu Met Glu Trp Leu Leu Pro Pro
          180          185          190

act acc gtg gaa gag gtg ttg gcc caa acc gtc aga gaa gtg atg acg 624
Thr Thr Val Glu Glu Val Leu Ala Gln Thr Val Arg Glu Val Met Thr
          195          200          205

gat ttc ctc gac cca gaa ata gga tta atg cgg gaa gcg gtg acc ccc 672
Asp Phe Leu Asp Pro Glu Ile Gly Leu Met Arg Glu Ala Val Thr Pro
          210          215          220

aca gga gaa ttt gtt gat agt ttt gaa ggg cgg ttg ctc aac cca gga 720
Thr Gly Glu Phe Val Asp Ser Phe Glu Gly Arg Leu Leu Asn Pro Gly
225          230          235          240

cac ggc att gaa gcc atg tgg ttc atg atg gac att gcc caa cgc tcc 768
His Gly Ile Glu Ala Met Trp Phe Met Met Asp Ile Ala Gln Arg Ser
          245          250          255

ggc gat cgc cag tta cag gag caa gcc att gca gtg gtg ttg aac acc 816
Gly Asp Arg Gln Leu Gln Glu Gln Ala Ile Ala Val Val Leu Asn Thr
          260          265          270

ctg gaa tat gcc tgg gat gaa gaa ttt ggt ggc ata ttt tat ttc ctt 864
Leu Glu Tyr Ala Trp Asp Glu Glu Phe Gly Gly Ile Phe Tyr Phe Leu
          275          280          285

gat cgc cag ggc cac cct ccc caa caa ctg gaa tgg gac caa aag ctc 912
Asp Arg Gln Gly His Pro Pro Gln Gln Leu Glu Trp Asp Gln Lys Leu
          290          295          300

tgg tgg gta cat ttg gaa acc ctg gtt gcc cta gcc aag ggc cac caa 960
Trp Trp Val His Leu Glu Thr Leu Val Ala Leu Ala Lys Gly His Gln
305          310          315          320

gcc act ggc caa gaa aaa tgt tgg caa tgg ttt gag cgg gtc cat gat 1008
Ala Thr Gly Gln Glu Lys Cys Trp Gln Trp Phe Glu Arg Val His Asp
          325          330          335

tac gcc tgg agt cat ttc gcc gat cct gag tat ggg gaa tgg ttt ggc 1056
Tyr Ala Trp Ser His Phe Ala Asp Pro Glu Tyr Gly Glu Trp Phe Gly
          340          345          350

tac ctg aat cgc cgg gga gag gtg tta ctc aac cta aaa ggg ggg aaa 1104
Tyr Leu Asn Arg Arg Gly Glu Val Leu Leu Asn Leu Lys Gly Gly Lys
          355          360          365

tgg aaa ggg tgc ttc cac gtg ccc cga gct ctg tgg ctc tgt gcg gaa 1152
Trp Lys Gly Cys Phe His Val Pro Arg Ala Leu Trp Leu Cys Ala Glu
          370          375          380

act ctc caa ctt ccg gtt agt 1173
Thr Leu Gln Leu Pro Val Ser
385          390

```

<:210>: 3

(第 5) 101-136982 (P2001-E\$ 率

```

<;211>; 24
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 3
gtgtaagctt tctgtatggg gtgt                24
<;210>; 4
<;211>; 26
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 4
gcagggatecc caaccaggca gcggaa                26
<;210>; 5
<;211>; 32
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 5
tttatcgata ttaattaggg ggaatgaatg ag          32
<;210>; 6
<;211>; 33
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 6
tttggatcct cattattccc cctgattttt gaa          33
<;210>; 7
<;211>; 36
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 7
taaatacgata ttgtatgat tgccatcgcg cgtcag       36
<;210>; 8
<;211>; 36
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Synthetic DNA
<;400>; 8
aaaggatcct taactaacgg gaagttggag agtttc       36

```

【図面の簡単な説明】

プラスミド pTA3 の造成工程を示す。

【図 1】は N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ発現

【図 2】は N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ発現

(特 6) 01-136982 (P2001-u7782)

プラスミド pYP18 の造成工程を示す。

【図3】はN-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ発現プラスミド pYP16 の造成工程を示す。

【符号の説明】

Amp^r : アンピシリン耐性遺伝子

P_L : P_L プロモーター

cI857 : cI857 リプレッサー

P_{lac} : lac プロモーター

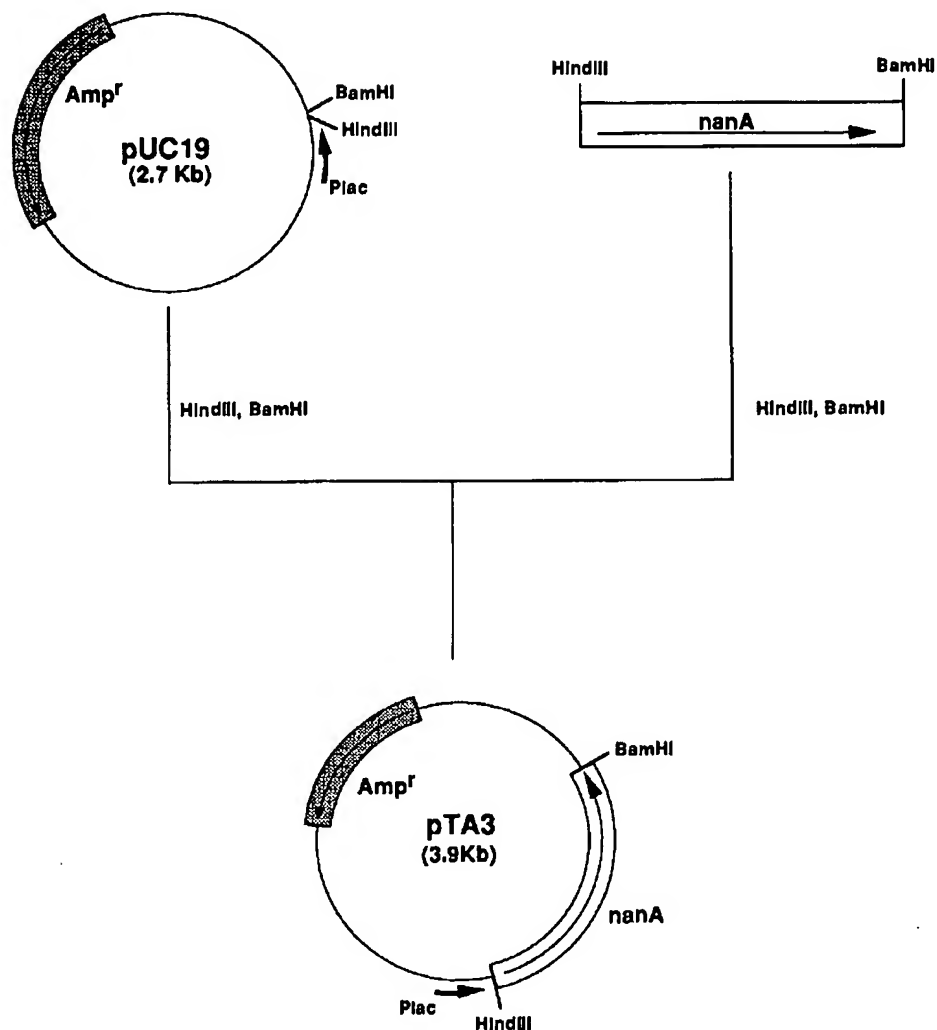
s1r1975 : N-アセチルグルコサミン2-エピメラーゼ遺伝子

nanA : N-アセチルノイラミン酸アルドラーゼ遺伝子

neuB : N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ遺伝子

【図1】

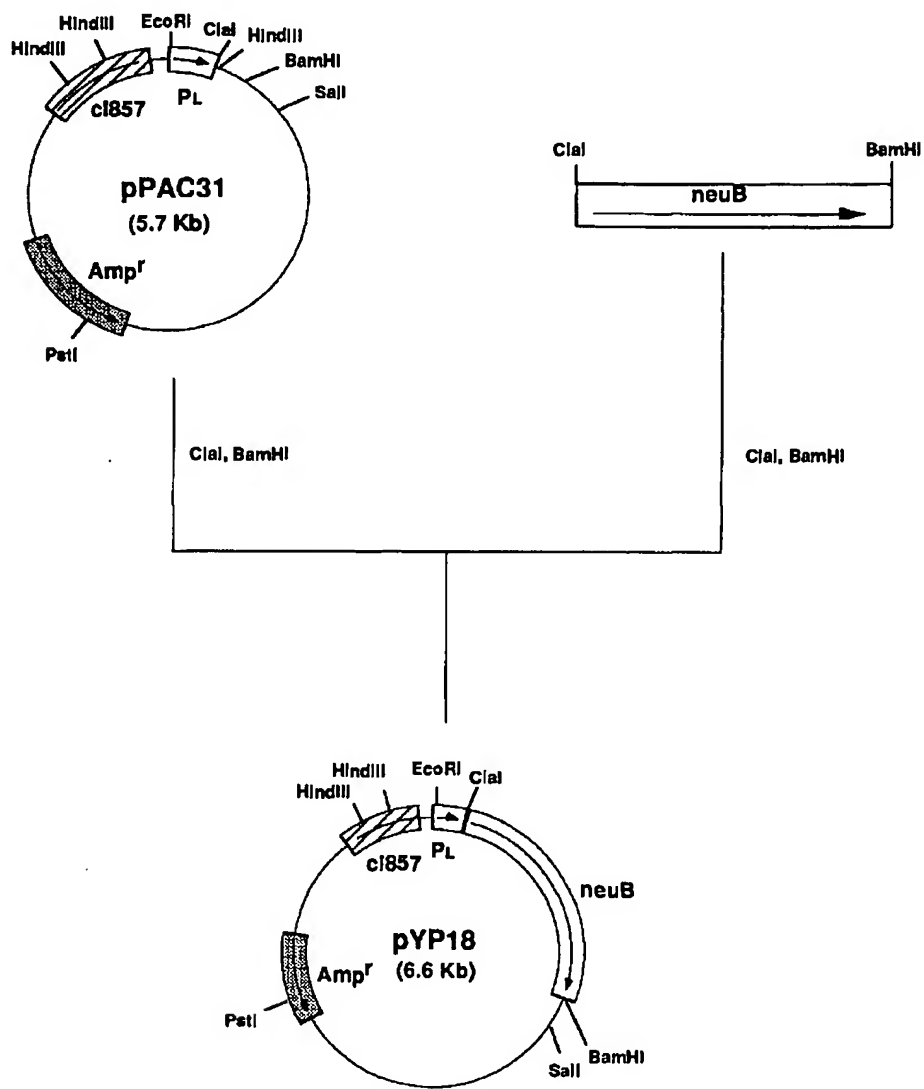
図1



(第 7) 01-136982 (P2001-n82

【図 2】

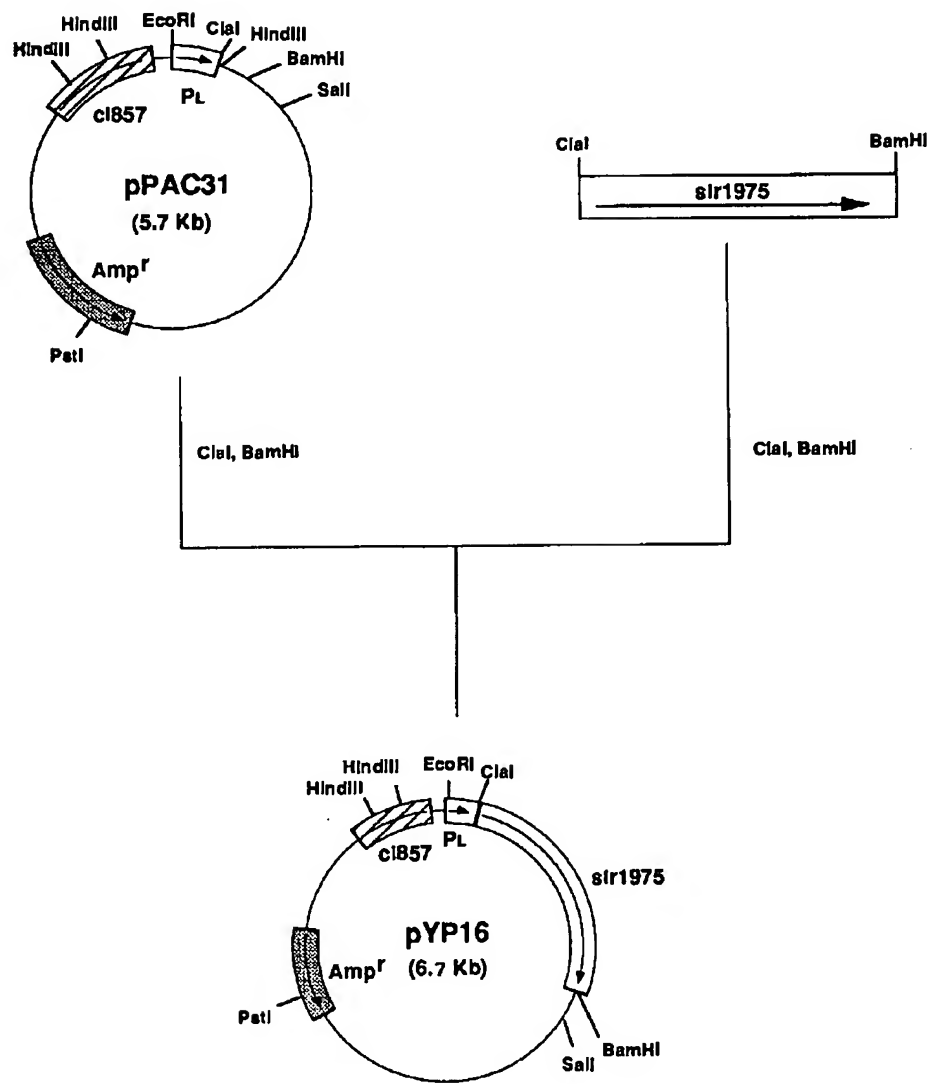
図 2



(8) 0 1 - 1 3 6 9 8 2 (P 2 0 0 1 - . 8 2

【 図 3 】

図 3



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 P 19/26		C 1 2 R 1:15)	
//(C 1 2 N 15/09	Z N A	1:31)	
C 1 2 R 1:15)		1:46)	
(C 1 2 N 15/09	Z N A	1:85)	

(9) 0 1 - 1 3 6 9 8 2 (P 2 0 0 1 - " 2

C 1 2 R 1:31)			1:01)
(C 1 2 N 15/09	Z N A		(C 1 2 N 1/19
C 1 2 R 1:46)			C 1 2 R 1:85)
(C 1 2 N 15/09	Z N A		(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:85)			C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 15/09	Z N A		(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:01)			C 1 2 R 1:15)
(C 1 2 N 1/19			(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:85)			C 1 2 R 1:31)
(C 1 2 N 1/21			(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19)			C 1 2 R 1:46)
(C 1 2 N 1/21			(C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:15)			C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 N 1/21			(C 1 2 P 19/26
C 1 2 R 1:31)			C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 1/21			(C 1 2 P 19/26
C 1 2 R 1:46)			C 1 2 R 1:15)
(C 1 2 N 1/21			(C 1 2 P 19/26
C 1 2 R 1:01)			C 1 2 R 1:31)
(C 1 2 P 19/26			(C 1 2 P 19/26
C 1 2 R 1:19)			C 1 2 R 1:46)
(C 1 2 P 19/26			(C 1 2 P 19/26
C 1 2 R 1:15)			C 1 2 R 1:85)
(C 1 2 P 19/26			(C 1 2 P 19/26
C 1 2 R 1:31)			C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 P 19/26		Z N A A	C 1 2 N 15/00
C 1 2 R 1:46)			C 1 2 R 1:15)
(C 1 2 P 19/26			1:31)
C 1 2 R 1:85)			1:46)
(C 1 2 P 19/26			1:85)
C 1 2 R 1:01)			1:01)

(72)発明者 尾崎 明夫
山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工
業株式会社技術研究所内